



TITLE:

眼の組織細胞の細胞培養における 分化転換(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

荒木, 正介

CITATION:

荒木, 正介. 眼の組織細胞の細胞培養における分化転換. 京都大学, 1979, 理学博士

ISSUE DATE:

1979-09-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r3971>

RIGHT:

学位申請論文

荒木正介

眼の組織細胞の
細胞培養における分化転換



眼における再生の研究

生物には失われた組織、器官を再びもと通りに復元する能力が備わっており、これは再生現象として広く自然界に見いだすことが出来る。特に植物や下等な動物では、この能力は強い。眼の組織についていえば、イモリでは水晶体を除去すると上部虹彩の色素上皮細胞が脱色、増殖して、もと通りに水晶体を再生する。これは有尾両生類、魚類に属するいくつかの動物やニワトリ初期胚（フ、卵、4日目くらいまで）で見られる現象で、ウォルフ再生と呼ばれ、1891年にエルクニーによって発見され、1894年にウォルフによって確認されて以来、多数の研究者の関心を集めてきた。⁽¹⁾⁽²⁾ また別の例として、網膜の神経層を除去すると、残された網膜色素上皮が脱色、増殖してもと通り神経層を再生する現象も古くから知られており、やはり両生類、魚類、ニワトリ初期胚で調べられていた。⁽³⁾

これらの再生の例では、いったん分化形質を獲得した細胞が、脱分化、増殖を経て全く別の性質をもつ細胞に再分化する過程が起きている。つまり再生の基礎をなす細胞レベルの過程として、分化の転換 (transdifferentiation)⁽⁴⁾⁽⁵⁾とも呼ぶべき現象 (組織のレベルでは化生—metaplasia—と古くから呼ばれてきた現象) が存在している。そして再生の過程が完成されるためには、さらに、かつて失われた部分を構成していたタイプの細胞の再生、産生、それぞれが正しく配置されるという条件が満たされねばならない。従って、再生の現象は、細胞分化、形態形成の機構を考えるうえで多くの示唆に富んだ、独特な研究系を提供すると考えられるのである。

図1は眼の組織におけるこのめざましい再生能力を、イモリの場合を例として整理したものである。⁽⁶⁾ここではすでに分化して特異的な形質を備えた細胞 (色素上皮細胞) が、別の形質の細胞 (網膜神経層、水晶体) に転換

するところから示されている。注意すべきは、転換にはある一定の方向があり、色素上皮→網膜神経層・水晶体の逆の変化は起こらないことである。このことは、イモリ以外の動物の眼の再生についても同様である。

細胞培養系での分化転換の検討

近年の細胞培養法の進歩は、生体におけるさまざまな生理現象をガラス器内の実験系で再現することを可能にし、多くの基本的な問題の解決のための有効な手段となった。さて、眼の再生の過程で起こる、この分化の転換というユニークな現象を細胞培養下に再現することができないだろうか？ それによって解決しうる問題は多い。ある形質をもった単一の細胞を培養下で追跡し、その子孫に別の形質の細胞が出現することを示すことができれば、分化の転換という事実の存在の厳密な証明となるだろう。さらには、イモリの眼をみられるわけでもない再

生能力がより高等な動物でみられないのは、細胞がもはや増殖能を失ったためか、それとも分化転換の能力がないためなのか、といった疑問や、何が再生の直接の引き金になっていくのだろうかといった疑問に答えることが、できるかもしれない。そして当然このような角度から、分化の決定、分化形質の発現にいたる増殖と分化の関連といった基本的な問題にアプローチすることもできよう。

以下本稿では、網膜色素上皮・網膜神経層をもちいた、細胞培養系において、これらの細胞の分化の転換の研究を紹介し、これらの研究を通じて何が明らかにされ、また新たにどのような疑問が浮かびあがってきたのかについて述べたい。実験にもちいられている動物の種類は、イモリの成体、鳥類やヒトの胚とさまざまあるが、ニワトリ胚をもちいてすすめられた研究を中心に話をすすめてゆくことにする。

眼の組織細胞の培養

培養の材料として何を選ぶか、イモリかニワトリ胚か、或いは色素上皮か網膜神経層か、によつてそれぞれ培養の条件に少々工夫が凝らされていゝが、ここではその詳細に立ち入らない。基本的には、組織をトリプシンや（プラス、または）EDTAで個々の細胞にまで解離し、それをプラスチックのペトリ皿にまいて牛胎児血清を含む合成培養液で培養する。これを経時的に観察して、どのようなタイプの細胞に分化してゆくかを追跡するわけである。そのために前もって、ここでもとり扱う色素細胞や氷晶体として神経性網膜細胞といった、出発点或いは経路にならざる細胞について、それぞれの固有の性質が培養下で、どう発現されているかを、同一の培養条件のもとで把握しておくことが必須である。

図2Aはフ卵8日目のニワトリ胚色素上皮細胞の、培養開始後10日目の位相差顕微鏡写真である。江口による。

電子顕微鏡の観察は、その構造が眼の中の色素上皮の構造上の特徴をすべて備えていることを示している。(7) またラットの色素上皮をもちいた別の研究では、もとの機能(食作用)もちゃんと培養下で維持されていることも知られている。(8) さらにメラニンやチロシナーゼ活性も生化学的に検出できる。(9) つぎに培養網膜神経細胞(網膜神経層)の特徴があるが、これについては幾分複雑である。というのは、網膜神経層はたゞつぱに分類して、神経細胞、視細胞、支持細胞の三つのタイプの細胞から構成され、三次元の立体構造のなかでそれぞれの機能にふさわしい位置を占めている。私達の培養条件は、この立体構造を再現するには不適當のようである。培養下では、図3Aにあるように軸索突起をのびた神経細胞を含む細胞塊(ロゼット)が多数形成される。視細胞の特徴を一部もった細胞も出現する。また高いコリンエステラルトランスフェラーゼ活性をもつことが調べられている。(10)(11)

分化の転換の終点と予測される水晶体についてはどう
 だろうか？ その分化を細胞培養で確実に検出できるだ
 ろうか？ 図2は分化直後のニワトリ水晶体上皮の培
 養である。ここに見られる大きな透明な細胞集塊は微細
 構造的に、良く分化した水晶体繊維固有の特徴を示し、
 また水晶体固有の各クラスのクリスタリンタンパクを合
 成し、免疫学的、生化学的にまったく同じ性質を備えて
 いる。(12)

以上のように、眼の各組織の特徴が細胞培養下で確
 かに発現されることを知ったうえで、次に、分化の転換の
 問題に移ることにする。

色素細胞の分化の転換

網膜色素上皮細胞が水晶体に分化転換を起こすことは、
 8日目ニワトリ胚の色素上皮を材料として、単一個の色
 素細胞をクローン培養することによって鮮やかに証明さ

(13) 1 10 15 20
 れた。これについてはすでに本誌オ43巻6号に江口と岡
 田による総説がある。ただこの場合、脱色、増殖をくり
 返して水晶体に分化するのに100日もの日数を必要とし、
 また6ヶ月に及ぶ培養期間を通じ、神経性細膜細胞の方
 向への分化の転換を示唆する変化は観察されなかった。
 後者の点については、たとえば神経細胞などへの分化能は
 保持していても、この系ではそれを発現できないという
 可能性がある。この点は今後の課題であらう。ただここ
 でつけ加えておかなければならないのは、若い時期の胚
 (7卵4~5日目)の細膜色素上皮を組織片のままに培
 養すると、細膜神経層に類似の構造が形成されるという
 報告である。(14) この構造には、電子顕微鏡の観察によれ
 ば、ミエーラ細胞や視細胞の分化が認められ、そしてこ
 の分化能は7日目以後の胚では失われる。
 最近、あらかじめエラーゲンでコートしておいたペト
 リ皿上で色素上皮細胞を細胞培養すると、水晶体への分

他の転換が阻止される」という興味深い報告がなされた。(15)

実際、眼の組織では、色素上皮は基底膜と呼ばれるラ
ーゲン性の支持層と強く接している。このような生体
の眼の中における構造が、各組織の機能的な協調性を保
っている可能性が考えられる。色素上皮細胞は、ラ
ーゲンでコートしたヘトリ皿を生体内に類似の環境と認
識するのかもしれない。

次に、イモリの成体の色素上皮細胞の培養についてい
れると、虹彩上皮、網膜上皮のどちらの組織も、培養下
で水晶体に分化することが証明されている。(16) ここで二
つの点について特に指摘しておく。サIは生体内での
ウォルフ再生は決して虹彩の下部からは起こらないにも
関わらず、この部分の色素細胞は細胞培養に移されると
ちゃんと水晶体に分化するのである。(17) 分化の転換
能をもつ細胞に上部と下部で量的な差があるかどうかを
クローン培養で調べたところ、有意の差は認められない。(18)

オ2の点⁵は、クローン培養¹⁰下で形成¹⁵されたコロニー²⁰に軸索様の細胞突起をもつ細胞が観察されることであって、成体イモリの網膜色素上皮細胞は培養下で、不完全ながら網膜神経層への分化を発現するらしいことを示している。⁽⁵⁾

色素細胞が氷晶体へ分化の転換をすることはレトの胎児においても証明され⁽⁹⁾、哺乳動物でも胚の時期にはこのような分化転換能を潜在的に保有していることが調べられている。

網膜神経層の分化の転換

生体内での再生において、網膜神経層が他の組織に分化する¹¹という報告は、網膜色素上皮のそれと比べてきわめて少ない。有尾両生類のいくつかの種類¹²の幼生で、レンズを除去すると氷晶体の再生が虹彩上部からばかりでなく、網膜神経層からもみられるという数例の報告が過

去にあるにすぎない。(20)

1975年、岡田および伊藤は、8日目のニフトリ胚網膜神経層が細胞培養下で色素細胞や水晶体に分化することを証明し、その過程を詳細に観察して報告した⁽⁹⁾⁽²¹⁾以後現在に至るまで、発生生物学的・細胞生物学的・分子生物学的に興味ある数多くの報告がなされている。色素上皮細胞から水晶体への分化がコラーゲン基質によって阻害されることについては前項で述べたが、網膜神経層の細胞から水晶体、色素細胞への分化も、設定されたいろいろな培養条件下で大きな影響を受ける。このような分化の転換に影響を及ぼす条件を探ることは、分化の方向を切り換えている要因を知るうえで重要な手がかりになると考えられる。以下では、以上の問題について研究の現状を述べる。

培養神経性網膜細胞

他の組織との分離が簡単かつ確実に、純粋な材料が豊富に得られるという利点から、ゆたかい研究分野で頻繁にもちいられているニトリ（またはウズラ）8日目胚の材料について述べる。この時期の網膜神経層は視神経細胞や視細胞が分化しており、形態的に組織の基本構築ができておがりつつあるといえよう。さて、取り出した組織を通常の方法によってペトリ皿にまく。通常は、径6cmのペトリ皿に $1 \sim 5 \times 10^6$ 個の細胞を植え、イーグルの最小培地に牛胎児血清（予め、いくらかのバッチをスクリーニングして好適なものを選んでおく）を6~8%添加したものを使う。細胞密度によって結果にいくぶん差の出ることが観察されているが、ここでは触れない。まかれた細胞は容易に基質に接着し、ロゼット状細胞凝集塊を形成する（図3A）。細胞塊から扁平な上皮細胞が周囲に這いつくし、この上皮細胞の増殖によって10~12日後には単層のシートができておきる。一方、細胞塊中

の小型の細胞は、他の細胞塊と軸索突起で互いに連絡しているのが観察される(図3B)。電子顕微鏡によれば、これらは神経細胞としての特徴を備えている。初期にプレート当りの細胞数が減少するのは(図4)、これら神経様の細胞がシートからはがれて培地中に浮いてくるためである。

次のステップは、細胞数の対数増加する時期である。これは上皮細胞の急速な増殖によるためで、この時期に、小型の多角型の上皮細胞が出現する。さらに細胞数は増加し、才三段階は培養後25~30日目に始まる色素細胞、水晶体の分化する時期である。色素細胞の分化は、上記の多角型の細胞がメラニン合成を開始して黒い顆粒を、もつので可視的に判別できる(図3D)。同時にレンズ上皮の培養で得られたものと構造的に類似した水晶体構造が出現する(図3C)。これにはレンズクリスタリンの全てのクラスのあることが、免疫学的に確かめら

れている。

形態的な観察にもとづく以上のような培養の経過について、胚発生の6日目から15日目頃までの材料では基本的には変わりはない。材料とする胚の時期と分化転換の関連についてはこのちに考察を加える。

細胞培養下で観察される細胞の分化の転換は、図5のようにまとめることができ。(21)

初期胚細胞神経層の培養

ところが、さらに若い7卵3.5日目頃(発生段階20,21)の初期胚の細胞神経層について培養を行なうと、8日目胚とは、相当異なった結果が得られる。(22)

この時期の細胞神経層は、形態的に未分化な神経上皮細胞からなっている。細胞けんだく液を検鏡すると、8日目胚の細胞に比べて直径にして約2倍の、大まかの均一な細胞である。

培養開始後2日目から、すでに急速な細胞数の増加が始まり(図4)、3日目には単層上皮細胞のシートが形成されている(図6A)。次の段階では(4~6日目)このシートの上に細胞の凝集塊が次々と出現し、互いに軸索突起様の繊維でつながっている(図6B)。8日目胚では、細胞を植えた直後に細胞突起でつながったロゼットが観察されたが、初期胚ではかなりの細胞数の増加のうちに形成される。ロゼットのサイズは8日目胚に比べ、全体に数倍以上大きい。この現象は、網膜神経層としての本来の分化のステップを反映したものと考えてよいだろう。

さて、これらの観察にわずかに遅れて(8~10日目)、小さい透明な球形の細胞集塊が出現し、すでに氷晶体の分化が始まったことを示している。ほぼ同じ時期に、上皮のシート中に小形の上皮細胞の島が出現し、まもなく黒い色素をもつようになる。培養後20日目頃には、細

細胞数の増加も静止期に入り、培養プレートは多数の氷晶
体、および色素細胞で覆われている。

分化転換の定量的解析

すでに見てきたように、培養下における氷晶体の構造
は、際立った特徴のある形態をもつ細胞集塊として認め
られ、その可溶性タンパクの主体をなすのは、 α -、 β -、 δ -
クリスタリンであって、氷晶体細胞に特異的なタンパ
ク質である（これは鳥類と爬虫類の場合であって、両生
類と哺乳類では、 α -、 β -、 γ -からなる。 δ -と γ -は免疫
化学的に異質である）。このうち、 α -と δ -は免疫電気
泳動によってそれぞれ一本の沈降線として同定され、筆
者らは分離精製した両クリスタリンでウサギを免疫し、
きわめて特異性の高い抗 α -、抗 δ -クリスタリンIgGを調
製し、分化の検定の試薬とした。SDS-ポリアクリル
アミドゲル電気泳動では、 δ -は分子量45,000、 α -は2万

と1万9千の2つのサブユニットである。
 水晶体上皮細胞をin vitroで培養すると、繊維分化に
 伴ってこれらのタンパクの量的パターンが変化すること
 はよく知られているが、⁽²³⁾網膜の培養ではどのような変化
 が見られるだろうか。3.5日目胚の網膜細胞が、短い期
 間で大規模に水晶体へ形態的分化することは、このよう
 な物質レベルの解析にかつこの系を提供してくれる。
 まず、 α 、 β -クリスタリン量の変動を調べる。各々の
 の抗血清のもつ高い特異性を利用して、定量性のある免
 疫電気泳動法(Laurell法)により、細胞の総タンパク
 あたりのクリスタリンの重量を測定したものが図7であ
 る。これから次のことがわかる。(1) α 、 β -クリスタ
 リンは免疫学的に培養後10日目には検出できる。(2) β -ク
 リスタリンはその後急激に増加し、26日目には総可溶性
 タンパク量のじつに43%を占めるまでにたつ。(3) α の
 量は β の1/10以下であり、20日目以降むしろ減少する。

螢光抗体法によつて調べると、 β -は水晶体構造に強く反応し、他の上皮細胞はほとんど陰性である。他方、 α -は両者ともに陽性に反応する。色素細胞はいずれのクリスタリン抗体にも反応しない。

胚からとりだした水晶体上皮を *in vitro* に置き、最初の5時間に合成された α -と β -の量を測定すると、発生の時期の進んだ胚を用いるに従い、 α -は増加し、逆に β -は減少する。⁽²⁴⁾ いろいろな発生段階の胚からとった網膜細胞を培養し、それらが水晶体に分化転換を開始する時期の α -と β -の量比を調べると同様の傾向が見られる。⁽²⁵⁾ また、同じ時期の胚の材料の培養については、培養日数の経過に伴つて β -に対する α -の比率は対数的に減少してゆくようである。これは3.5日目胚ではとくに顕著に見られる(図8)。

もう一つの分化転換の産物である色素細胞については、その分化度を量的に検定する方法として、チロシナーゼ

活性の定量と、シンチレーションカウンタ測定用の組織溶解剤“ソルエン100”で細胞を溶解し、400nmの吸収量によって直接にメラニン量を知ることができる。(26) 培養細胞不モジュネートの遠心上清を使ってクリスタリン量を測定し、一方残りのペレットでオ2の方法によってメラニン量を測定すると、同一のサンプルによって2つの分岐の定量が可能である。図9は、培養開始後11日目以降急激なメラニン量の増加のあることを示している。

タンパク合成

クリスタリンの合成のパターンが、 α -, β -, δ -の各クラスごとに異なることは、上に述べたいくつかの事実からすでに完全に予想される。これを明らかにするには、培養液中に ^{14}C -ロイシンを加え、一定時間内に合成される全てのタンパクを標色し、培養細胞の不モジュネート

の遠心¹上清²を各クラス³のクリスタリン⁴の抗血清⁵ IgG⁶分画⁷と反応⁸させて、生じた抗原抗体沈降物⁹中の放射能活性¹⁰を測定すればよい。(27)

図10に示されたように、培養後9日目に α 、 β -クリスタリンの合成は認められ、その後 β -は急速に増加し、20日目に最大値に達す。26日目になると、2時間内に一枚の培養皿の全細胞の合成している総可溶性タンパクの、なんと半分近くが β -クリスタリンという特異なタンパク質であるという、めざましい結果が得られる。一方、 α -は12日目にすでに合成活性は最大で、むしろその後減少する。

ここで問題になるのは、このような測定方法が、上清分画中に含まれるタンパクのうち、特異抗原だけを、しかもその全量を捕捉できているかどうかという点である。この点は、それぞれの抗体を結合したセファロースカラム(Affinity Chromatography)によって解決さ

(27)
れに。
よ、 β -の合成について以上の知見は、神経性網膜細胞が氷晶体に分化するとき、 β -の合成の選択的かつ劇的な増加を伴うことを示している。あざに述べたように、発生するすんだ胚からとった神経性網膜細胞の培養では、氷晶体の分化の始まる時期は遅れ、 α -、 β -の量比も初期の材料の培養に比べ大きく変動している。この原因としては、(1)分化した氷晶体繊維における各クラスのクリスタリンの合成の比率が、どの時期の胚の網膜神経層を材料とするかによって異なり、(2)主に α -を合成する細胞と、主に β -を合成する細胞の数の比率が変化することなどが挙げられる。分離した氷晶体構造を構成するポリペプチドの解析や蛍光抗体の結果から、細胞数の比率の変動があらわになっていそうである。
次に、培養網膜細胞のクリスタリン以外のタンパク合成について見てみよう。これには、例えば、遠心上清

分画を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、ポリペ
プタイドの構成の変動を追跡すればよい。二次元電気
泳動法を用いれば、さらに詳細な知見を得ることができ
るであろう。図 11 は ¹⁴C-ロイシンで標色したサンプル
の電気泳動のオートラジオグラフィで、培養の各段階
でポリペプタイドの合成が次々と変化してゆくのがわか
る。8-と 9-に対応するバンドの変化は、前項で述べた
結果とよく対応している。他のバンドについては、B、
C のように初期に培養に合成しているものや、^AD のよう
に培養期間を通じてほとんど一定量が合成されているも
のがある。B や C が、培養の初期に分化する神経細胞
に由来したものであるという可能性はあるが、現在のと
ころ同定できていない。細胞培養下で追跡しようとする種々
の形態的な現象の進行を、すべてこのゲルパターンで説
明するのは困難であるが、今後有力な解析手段になると
期待される。

網膜細胞の分化を決めるもの
培養下に移された網膜神経層は、形態的に、神経細胞、
氷晶細胞・色素細胞に分化するが、材料とする胚の発
生時期によって結果が左右されることについてほすでに、
述べた。

普通のニワトリの倍の速さで成長するHy-1という系
統のニワトリがある。この胚の網膜神経層の細胞を培
養すると、通常のものに比べていくぶん早く氷晶体に分
化し、またクリスタリンの各クラスの量比も異なるとい
ふと報告されている。⁽²⁸⁾

分化の転換の程度、その過程が間接的にせよ、ある遺
伝的な資質によって左右されている可能性があるが、こ
れは今後の研究に待ってして、ここでは、*in vitro*の培
養条件（培養液の種類など）が分化の量的な程度に与え
る効果について少しふれてみよう。外部的な環境によ
るコントロールの例を数多く検証してゆくことは、分化

転換の機構を探るうえで、確かに一つの有用な手段であり
らう。

伊藤の報告では、⁽²⁹⁾透析した血清を用いてニワトリ8日
目胚の網膜細胞の培養を行なうと、扁平な細胞からなる
一層のシートが形成され、それ以上増殖もせず分化もし
ない、いわば「休眠的状态」になる。これにアスコルビン
酸 (Vitamin C) を添加すると、増殖は再開し水晶体・色
素細胞が分化する。

別の例を挙げよう。ある種の培地では、増殖は
まったく正常であるが分化のパターンが変化し、色素細
胞の分化は阻害されクリスタリンの量的な比率が大きく
変わるといふようなことも起る。⁽³⁰⁾ 細胞培養に用いる
合成培地には、数多くの研究者の考案したものが種々あ
り、私達は通常はイーグルの最小培地 (Eagle's MEM)
を使っている。これを別の培地、例えば「ハチ」の F-12 で
培養した結果と比較してみよう。F-12 培地は MEM 培地、

に比較してアミノ酸・ビタミンがさらに質的に豊富である。
 いずれの培地でも細胞は旺盛な増殖能を示し、
 増殖曲線は同じパターンである。ところが、F-12培地
 では水晶体への分化はごくわずかに観察されるにすぎず、
 これをクリスタリンの産生レベルと比較すると図12のよ
 うになる。さらに比べてd-の量はあまり差が見られない。
 水晶体や色素細胞に分化する以前にまず前駆細胞の状態
 を経ると考えるならば、F-12培地では前駆細胞の状態の
 まま長く維持され、一方MEM培地は分化形質を発現す
 るのに好都合の環境を提供するという推測ができる。
 この初代培養をさらに継代してゆくと、二通りの培
 地にわけ、d-、f-の産生が継代後の培地によってどう
 影響されるかを調べると表1のような結果になる。す
 なわち、各クリスタリンの産生は、前歴、つまり初代で
 どちらの培地を用いたかというよりも、現在才2代目に
 用いられていゝ培地にこそ、はる依存するのである。ま

た、F-12培地を用いた初代培養をMEM培地に移すと、色素細胞の分化も観察される。このような培地の効果は、少数培養では必ずしもはっきり出ないので、培養している細胞の代謝産物による二次的な効果がある可能性もある。

初期胚網膜神経層の多能性

多数培養下で観察される水晶体や色素細胞に分化する細胞は、それぞれ別の前駆細胞の子孫であるのか、それとも水晶体にも色素細胞にも分化できると多分化能をもった前駆細胞が網膜神経層には含まれているのだろうか。この問いに答えるこのことができる直接的な実験手段としてクローン培養法がある。まずに色素細胞をクローン培養して、その子孫に水晶体が出現することを証明した例を紹介した。このクローン培養法によつて、3.5日目胚の網膜神経層には水晶体・色素細胞の両方に分化の

多能的な細胞の存在が証明され、そのようにコロニーの数はコロニー総数の20%という比率であった。色素細胞にのみ分化するコロニー、氷晶体にのみ分化するコロニーはそれぞれ30%、33%であった。あるコロニーでは、培養後約一週間ですす神経細胞の分化が観察され、さらに培養を続けると色素細胞・氷晶体のいずれにも分化することを確認されている。こうして少なくとも3つの方向に分化可能な細胞の存在することがわかる。(31)

もう少し発生すすんだ8日目胚について同様の解析を試みたところ、現在のところではこのような多能的な細胞の存在は認められない。(32) より発生が進んで神経層としての三次元の配列ができてくるとともに多分化能力が失われ、さらには分化の転換能そのものが喪失するらしい。

組織が細胞培養に移されるとときには、個々の細胞に分離されるまでの相互の接触を失う。組織内で保たれ

2 5 10 15 20 25
 といった相互の認識が失われ、拘束を解かれた細胞は増殖
 のサイクルに入った後、色素細胞や氷晶体に分化する。
 すでに何度か言及したように、網膜神経層は生体内での
 多層構造の位置に応じて各タイプの細胞がプログラムに
 従って分化し、秩序正しい配列をつくりあげてその機能
 を保っている。現在の培養条件は、このような高次の
 構造を維持するのには適当でないのであらう。網膜神
 経層としての本来の分化形質である神経細胞が、常に上
 皮細胞シートの上に見られるのは、細胞シートという支
 持体の必要を示しているのではなかろうか。従って、
 よりふさわしい培養条件を与えてやるならば、培養条件
 下で検出可能な多能性のレポーターがさらに増えるであ
 らう。

分化転換のメカニズムについての考察
 網膜神経層の培養を通じて、この組織が *in vivo* では

表現されない分化能を有していることが明らかにあった。
 細胞培養に移すといとも簡単に氷晶体や色素細胞に分化
 するにも拘らず、何故、眼の中では神経層として分化が
 安定に保たれているのだろうか。すでに前項で組織の
 解離による細胞相互の認識の喪失が、分化転換のための
 スイッチを入れることになっているという考え方を述べた。
 この様な発想を支持するいくつかの実験がなされている。
 たとえば、両生類の原腸胚を材料とした実験では、組織
 を解離することによって細胞表面の性質が変化し、イオ
 ンの透過性が変わり、この変化が最終的には分化形態の変
 更をもたらす。⁽³³⁾ また、器官培養された氷晶体を使った
 別の実験では、細胞内の Na^+/K^+ の比率がタンパク合成の
 制御に重要な意味をもつことが調べられている。⁽³⁴⁾ 網膜
 の分化転換についてのこのような面からの考察は今後の
 研究に待たねばならない。
 イモリの成体の虹彩上部から氷晶体が再生するとき、

は、水晶体の特異性が発現されるより以前に、まず虹彩
 上皮細胞が何回か分裂する必要がある。網膜色
 素上皮細胞をクローン培養下におくと、できたコロニー
 の約 $\frac{1}{3}$ は、その細胞数が 300—1,000 に達したとき、同
 調的に水晶体に分化するのが観察される。このことは
 8—10 回の細胞周期に相当することになる。(5) 神経性網
 膜細胞では今のところこのようには解析はされていはい
 が、分化の方向が転換するのに必要は分裂回数といっ
 たものがありそうである。ニワトリ初期胚の神経性網膜
 細胞は、細胞培養下に移されるや否や急激な増殖を始
 める。これが、早い時期に分化転換が起こる原因と考え
 られないだろうか。というのは、3.5 日目胚と 9 日目胚
 の増殖曲線からそれぞれの培養網膜細胞の世代時間を割
 り出し、この値で、水晶体の分化が始まるまでの時間を割
 ると、いずれも 5—6 になる。この値はイモリの網膜
 色素上皮の値よりも 3—4 小さい。

コラーゲン基質が、色素上皮細胞から水晶体への分化転換を阻止する効果のあることはすでに知られたが、神経性網膜細胞の場合には、逆にむしろかえらう分化の時期を早める効果がある。そしてこの場合にも、細胞数の増加は、コラーゲンでコートしたペトリ皿の方がコートしていないペトリ皿より大きいことが認められる。

ふわりに

ガラス器内の純化された細胞培養系で、分化転換現象の研究が開始されてすでに6年の時間が経過し、これまでに多くのバラエティーに富んだ報告がなされてきた。この系は、分化の終点——つまり水晶体——を分子的に確実に固定することが容易であり、比較的、定量的に取り扱いやすい。ここでは分子生物学的なアプローチについてはいふことがなかったが、現在いくつかの研究室で分化転換の分子メカニズムに多くの興味が寄せられて

いる。その中でも特に興味あるものとして、ニワトリ
 の8日目胚細胞神経層、細胞色素上皮のmRNAには、
 レンズクリスタリンのmRNA鎖と類似した部分がある
 らしいという発見がある。そしてこのような共通性は、
 筋肉などには見られないという。⁽³⁵⁾つまり、水晶体への
 分化転換の可能な細胞に限って、生体内でもクリスタリ
 ンmRNAの転写までは起きているのではないかと、と
 いうのである。この事実が、実際に培養下で分化が転
 換する事実とどのように関連しているのかは今後の研究
 に待たなければならぬ。しかし、この発見が事実と
 して確かめられれば、現在まで全く説明されていな
 かった細胞のもつ多分化能と分化のプログラムニングの決
 定の分子機構の研究への出発点ともなえるかもしれない。
 次に、「癌化」という問題を考えるうえにも、この培養
 系での分化転換の研究はきわめて有用な示唆に富んだ情
 報を与えてくれるであろうと思われる。たとえば、ヒト細胞

芽細胞腫は、このような細胞培養系で色素細胞や水晶体に分化する。(36) 正常のヒト胎児神経性網膜細胞も同じ性質をもつ。従って網膜芽細胞腫は、胎児期において若い網膜細胞に特徴的である分化能を保持したまま癌化のコースに入ったものと推測できる。(37)

そもそもこの系の開発が、ウオルフ再生という現象を細胞培養系で再現させることによつて、細胞レベルでの解析を可能にすることを目的として試みられたことを思うとき、常に生体内の現象に立ちもどつてそこに隠れていふヒントに学んでゆかねばならないだろう。

5 10 15 20 25

文 献

(1) T. Yamada: In Progress in Differentiation Research (M. Müller-Berat, ed.) 355
North-Holland, Amsterdam. (1976)

(2) 江口吾朗: 科学 35, 126 (1965)

(3) G. V. Lopaschov & A. A. Sologub: J. Embryol. exp. Morph. 28, 251 (1972)

(4) T. S. Okada: In Tests of Teratogenicity in vitro. (J. D. Ebert and M. Marois, eds.) 91. North-Holland, Amsterdam. (1976)

(5) G. Eguchi: In Embryogenesis in Mammals (Ciba Foundation Symposium 40) 241
North-Holland, Amsterdam. (1976)

(6) 江口吾朗: 代謝 13, 183 (1976)

(7) 江口吾朗: サイエンス 5月号, 66 (1977)

(8) R. B. Edwards & R. B. Szamier: Science 197, 1001 (1977)

(9) Y. Itoh et al.: Develop. Growth and Differ. 17, 39 (1975)

(10) K. Nomura & T. S. Okada: Unpublished data

(11) P. Crisanti-Combes et al.: Develop. Biol. 65, 228 (1978)

(12) T. S. Okada et al.: Develop. Biol. 34, 321 (1973)

(13) G. Eguchi & T. S. Okada: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 70, 1495 (1973)

(14) Y. Tsunenatsu: Doctoral Thesis (the University of Kyoto). (1975)

(15) K. Yasuda: Develop. Biol. 68, 618 (1979)

(16) G. Eguchi: In Mechanisms in Cell Change. (J. S. Ebert and T. S. Okada, eds.)
Wiley, New York. (1979)

謝 辞

京都大学理学部生物物理学教室において著者が研究を
すすめるにあたって、指導教官である同教室岡田節人教
授には常に有益な御助言・御指導を頂きました。深く、
感謝致します。

また常に暖かい励ましをくださった名古屋大学理学部分
子生物研究施設江口吾朗教授，京都大学理学部生物物理
学教室柳田充弘教授，安田國雄博士にも数多くの御助言
を頂くことができました。感謝致します。

図の説明

図1 イモリにおける眼の色素上皮細胞の分化転換の様式を示す模式図。矢印は分化の転換が可能な方向を示している。(文献(6)より引用)

図2 ニワトリの眼の組織細胞の初代培養。(A)培養後10日目の色素上皮細胞。(B)培養後10日目の晶体上皮細胞。晶体繊維化がよく見られる。

図3 ニワトリ8日胚神経性網膜細胞の初代培養。D図では色素細胞の分化が見られる(矢印)。(A)培養後2日,(B)12日,(C)35日,(D)35日。

図4 神経性網膜細胞の初代培養の増殖曲線。Lは晶体への分化転換のほじまった時期を示す。

○—○ は 3.5 日胚, ○---○ は 8 日胚のもの。

図 5 眼の組織細胞の細胞培養下における分化転換をまとめた模式図。 → は文献(21), ---→ は文献(14), ---→ は文献(13)で確かめられた。(文献(21)より引用)

図 6 ニワトリ 3.5 日胚神経性網膜細胞の初代培養。
図 13 では巨大なロゼットが形成されている(矢印)。

図 7 3.5 日胚神経性網膜細胞の初代培養におけるクリスタリン量の変動。培養細胞の mg タンパク当りの重量で表わされている。

図 8 いよいよ発生段階からとった神経性網膜細胞の培養の経過に伴う 2 つのクリスタリンの量比の変

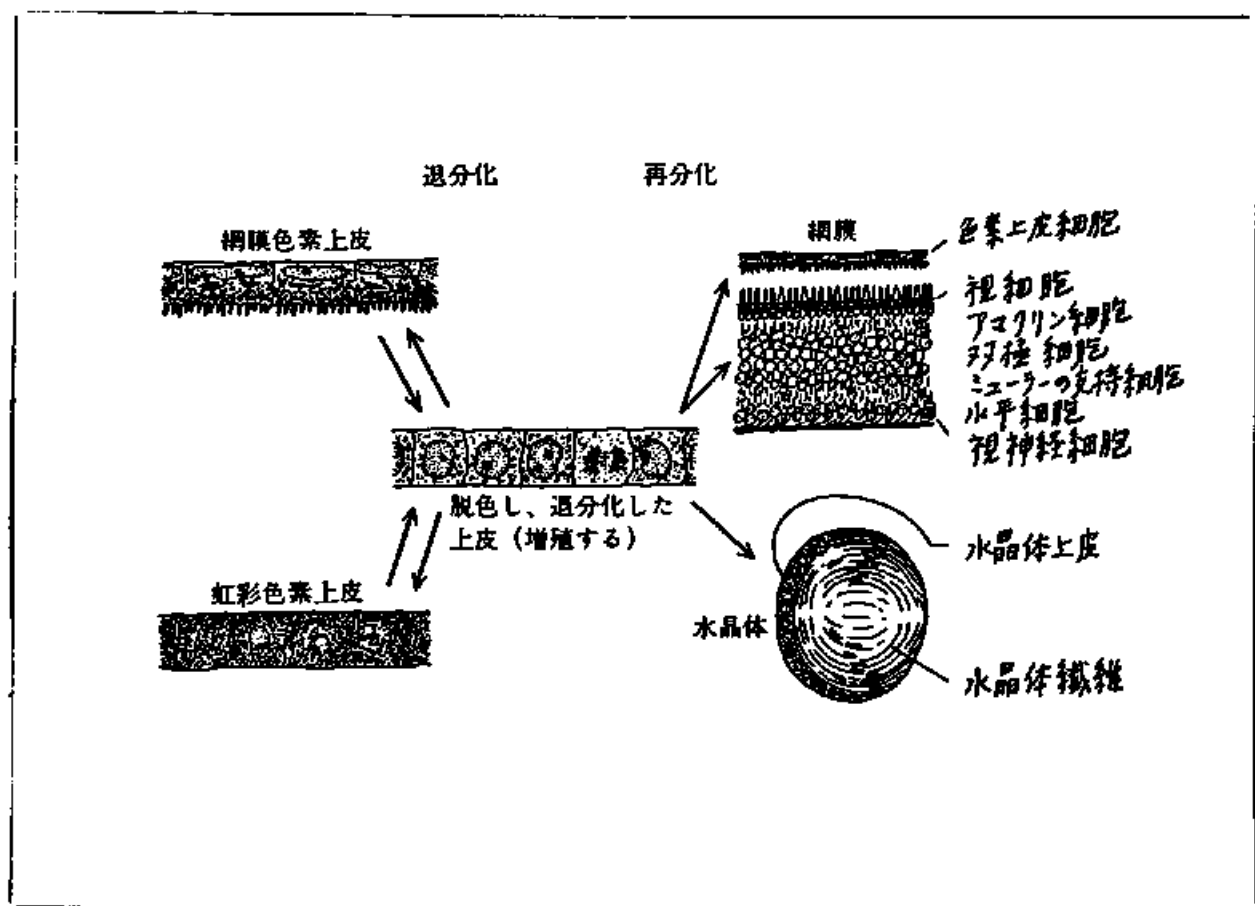
動。文献(24), (26)をもとに作製したもの。

図9 3.5日胚神経性細胞培養におけるメラニン
量の変動。細胞のmgタンパク当りの量で表わ
してある。

図10 クリスタリン中に取り込まれた放射能活性の変動。
3.5日胚神経性細胞培養。○—○ β-クリ
スタリン, ○---○ α-クリスタリン。

図11 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動のオートラ
ジオグラフ像。3.5日胚神経性細胞培養。
α-やβ-に比べ、β-にはあまり変動が見られない。
写真の左より、6日、9日、12日、15日、18日、
21日、24日、30日の培養。

四 12 クリスタリンの量に及ぼす培地の効果。 3.5 日
胚の神経性細胞の培養。 ●—● Eagle's MEM,
○---○ Ham's F-12。



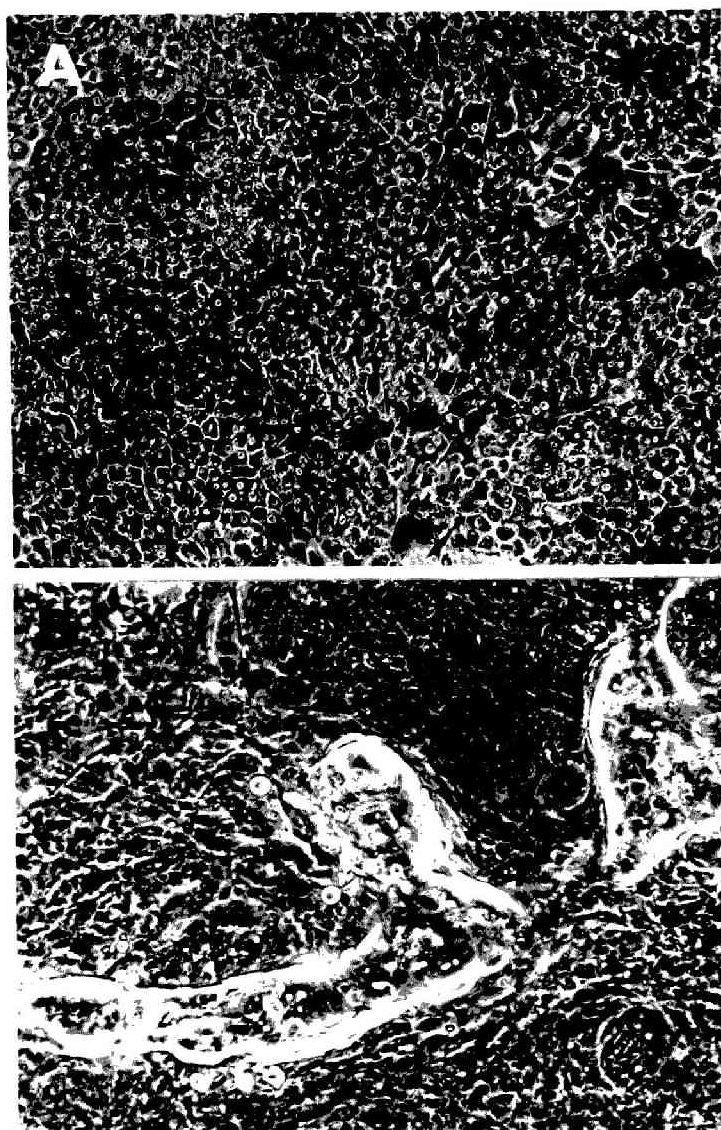


图 2

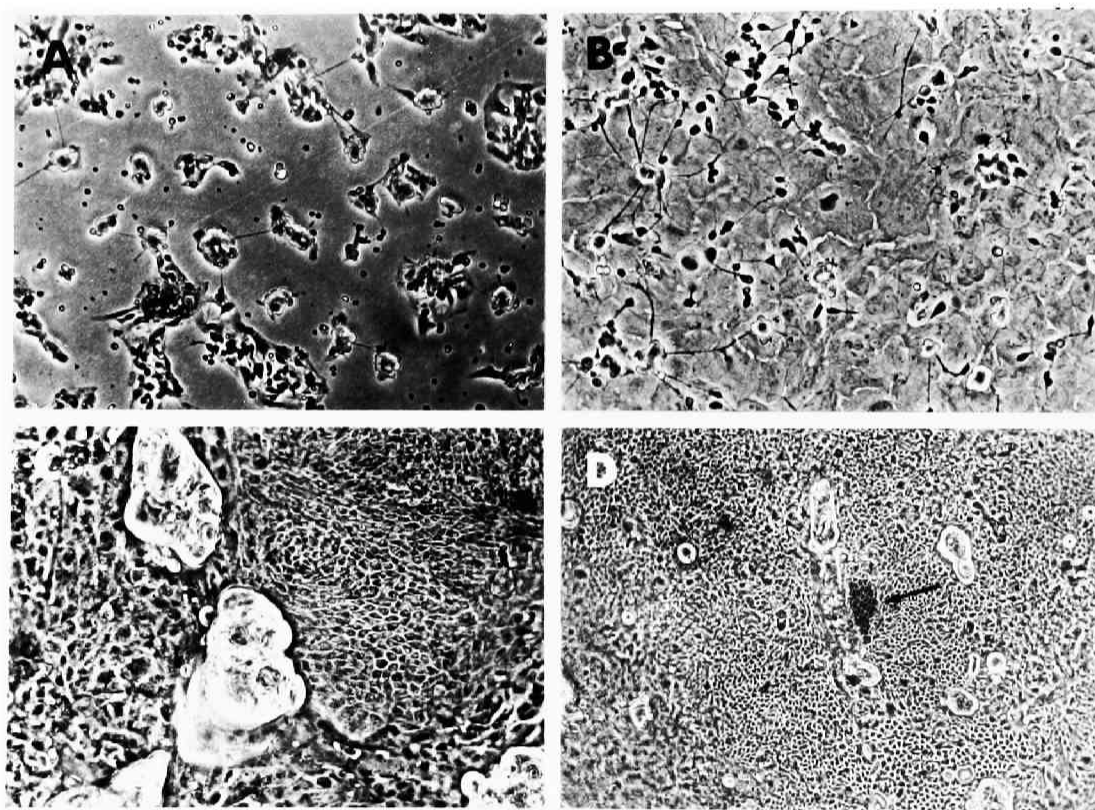


图 3

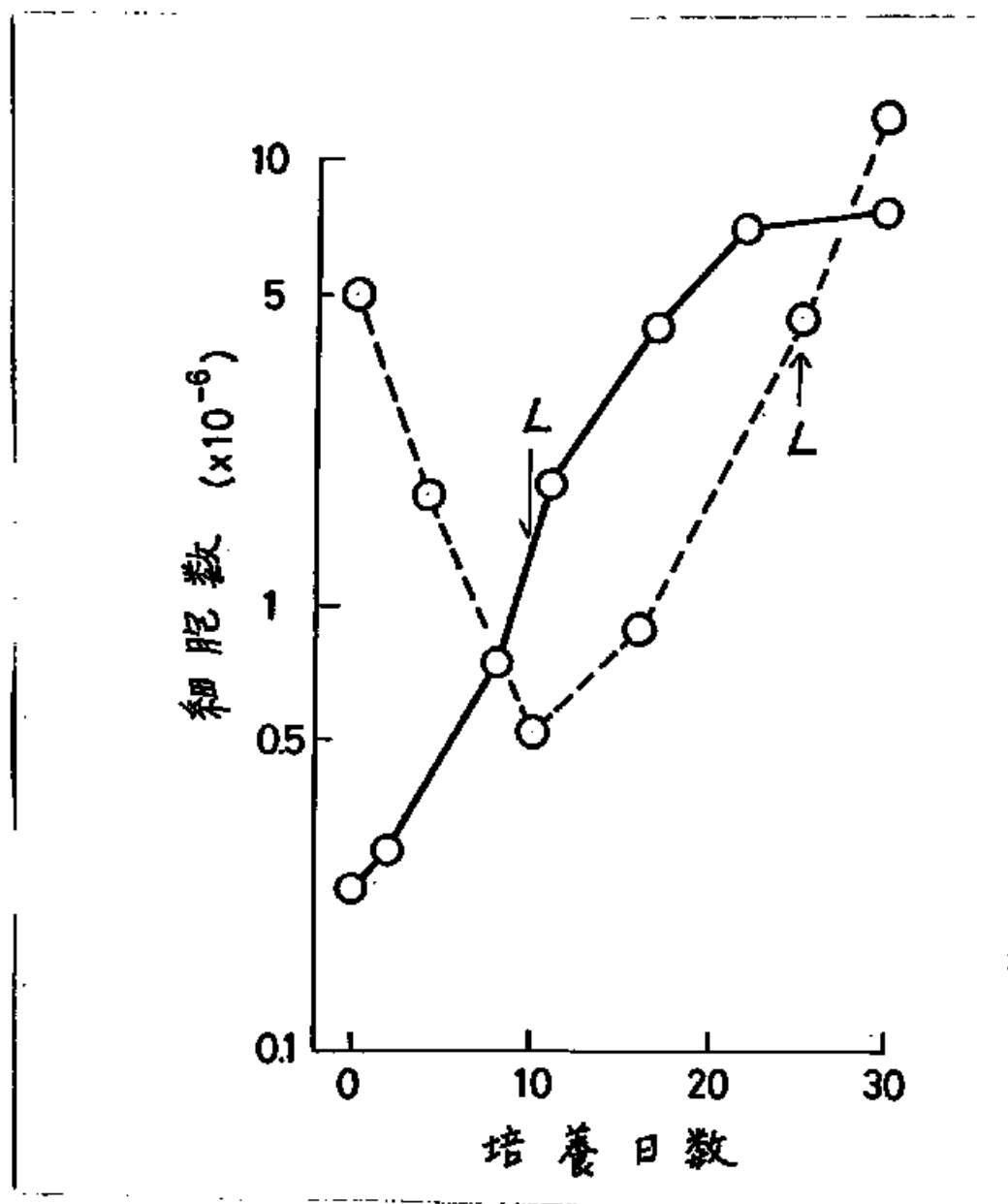
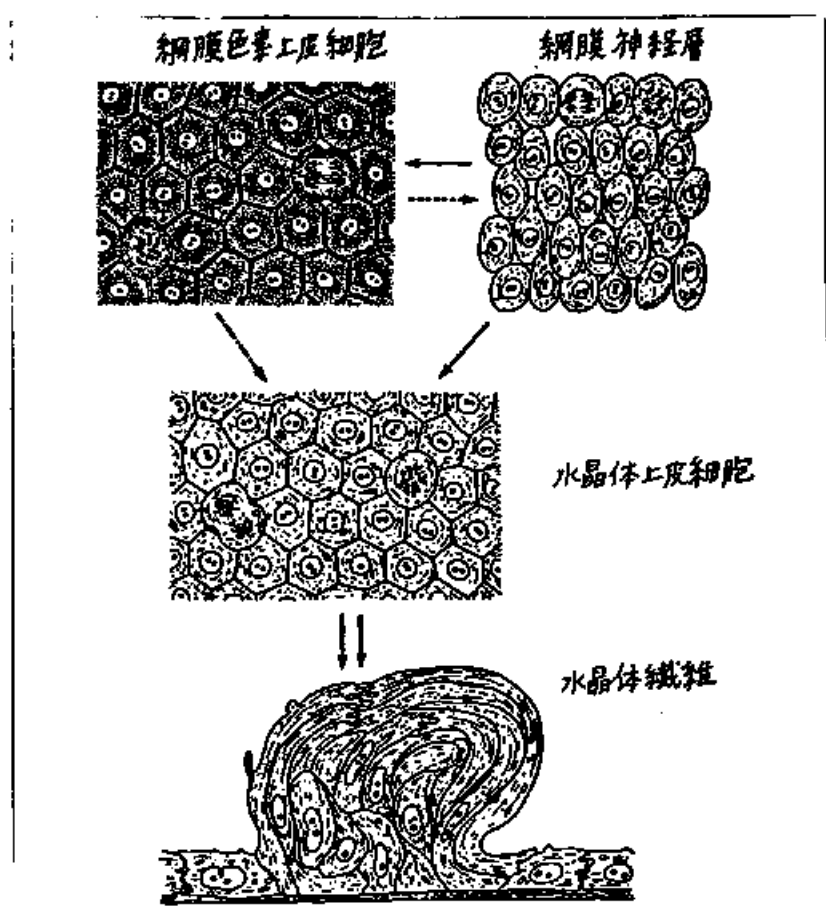
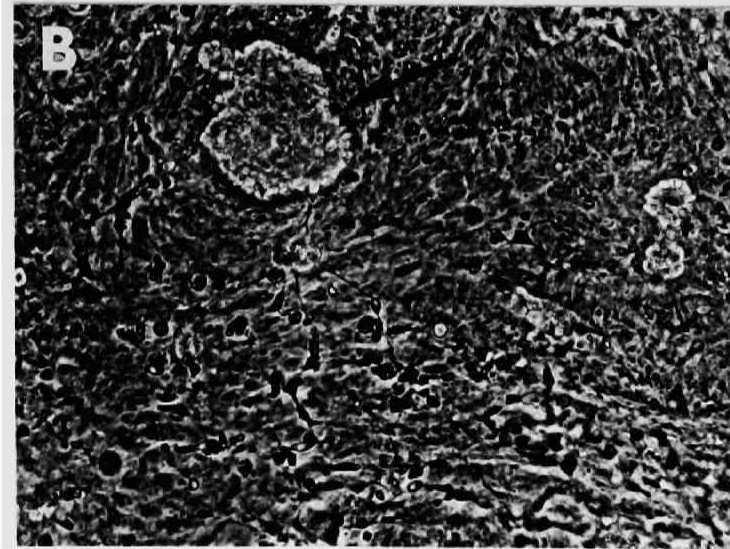
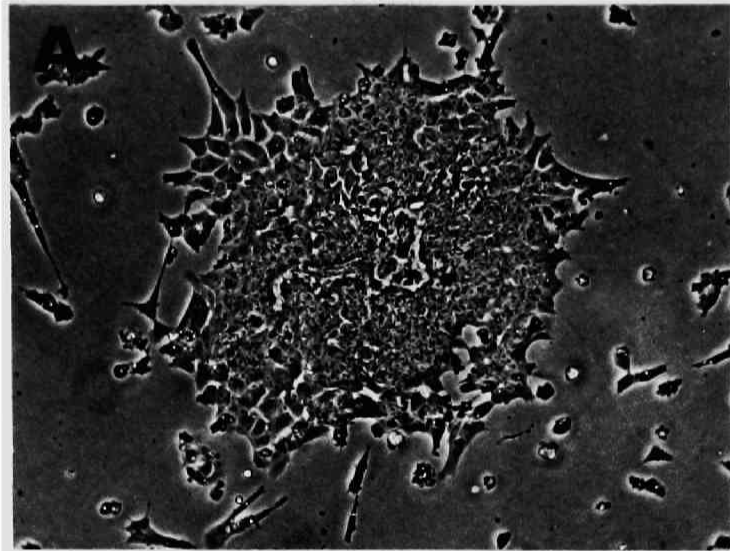


図 4





17 6

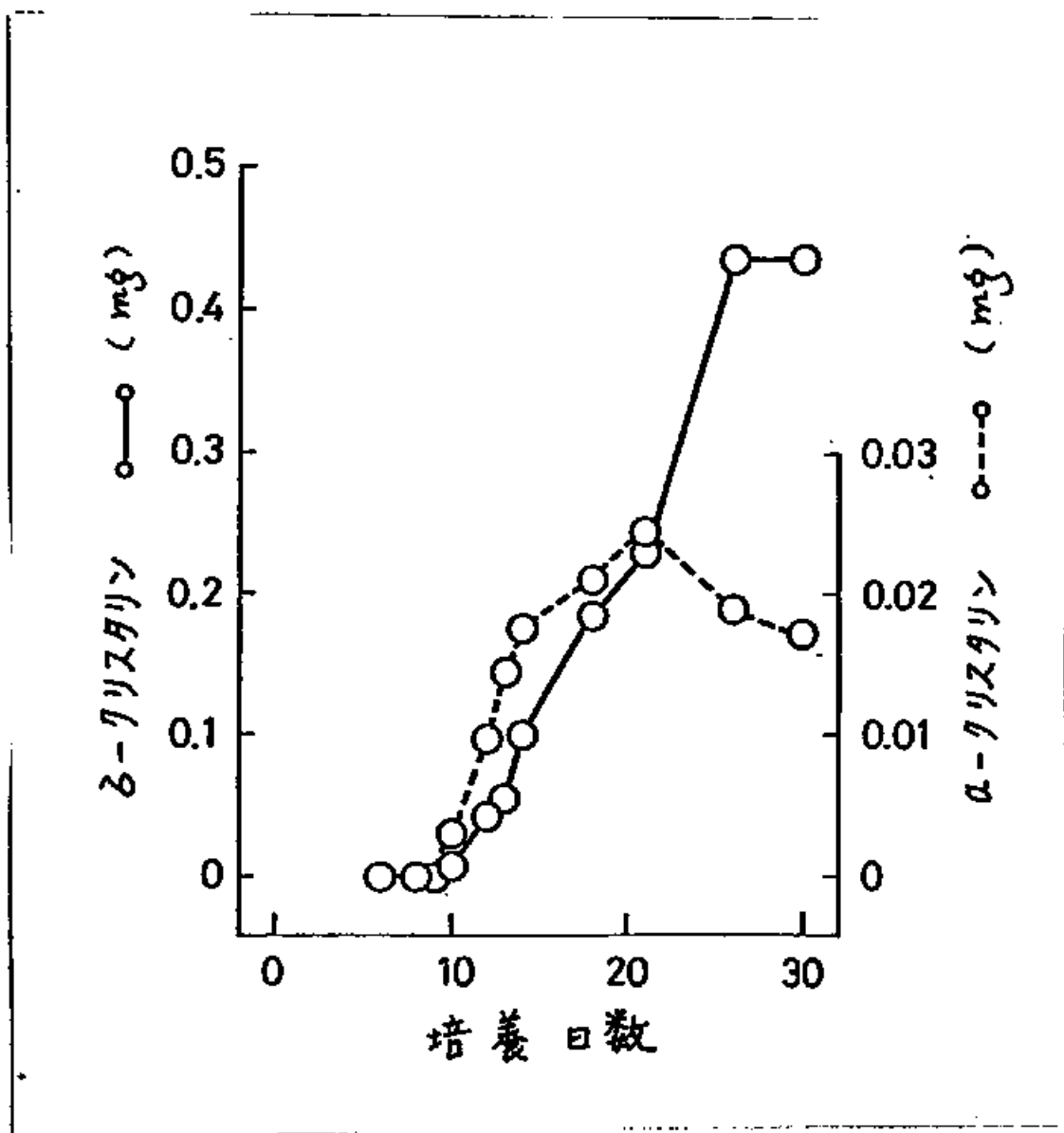


図 7

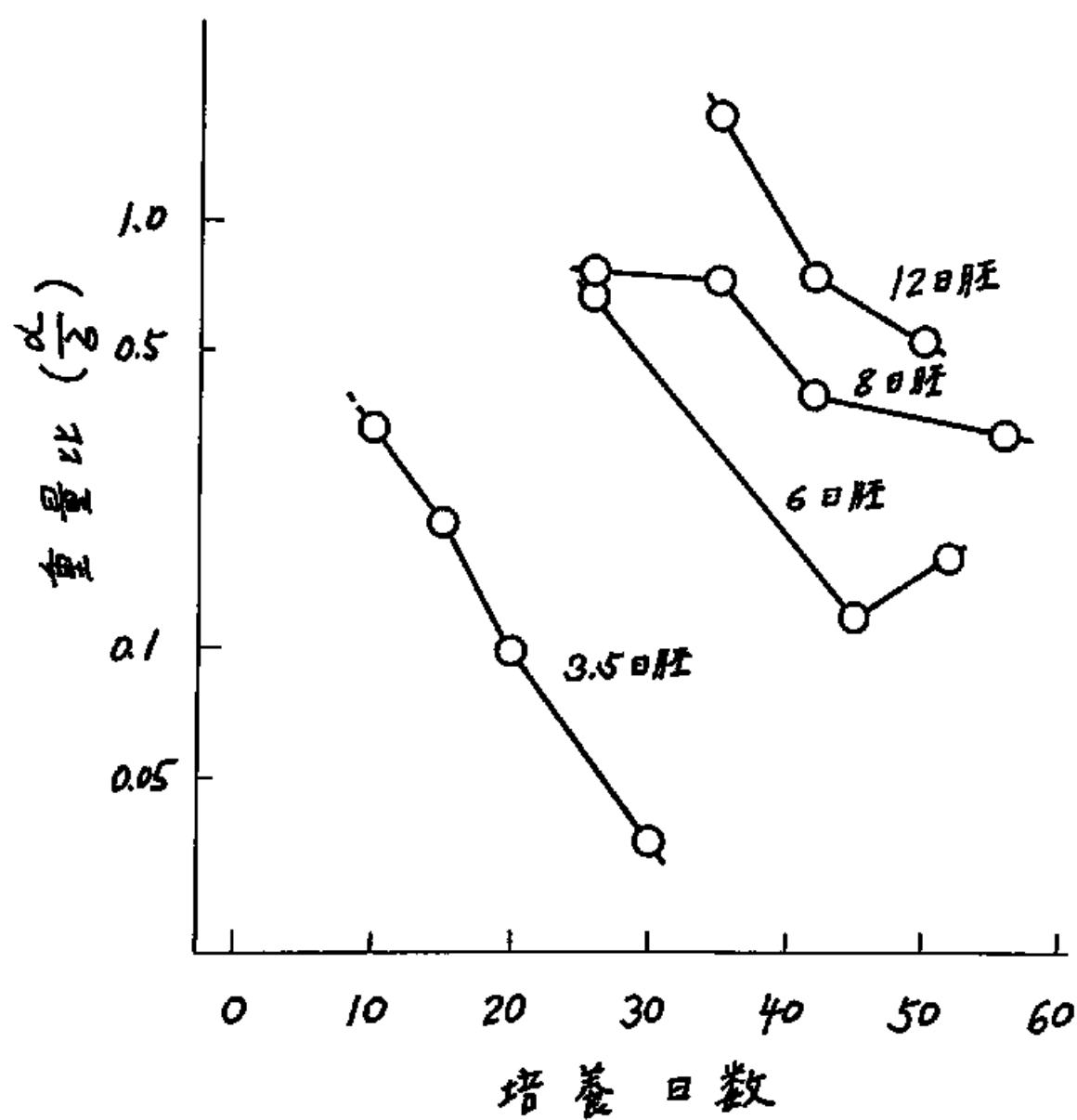


圖 8

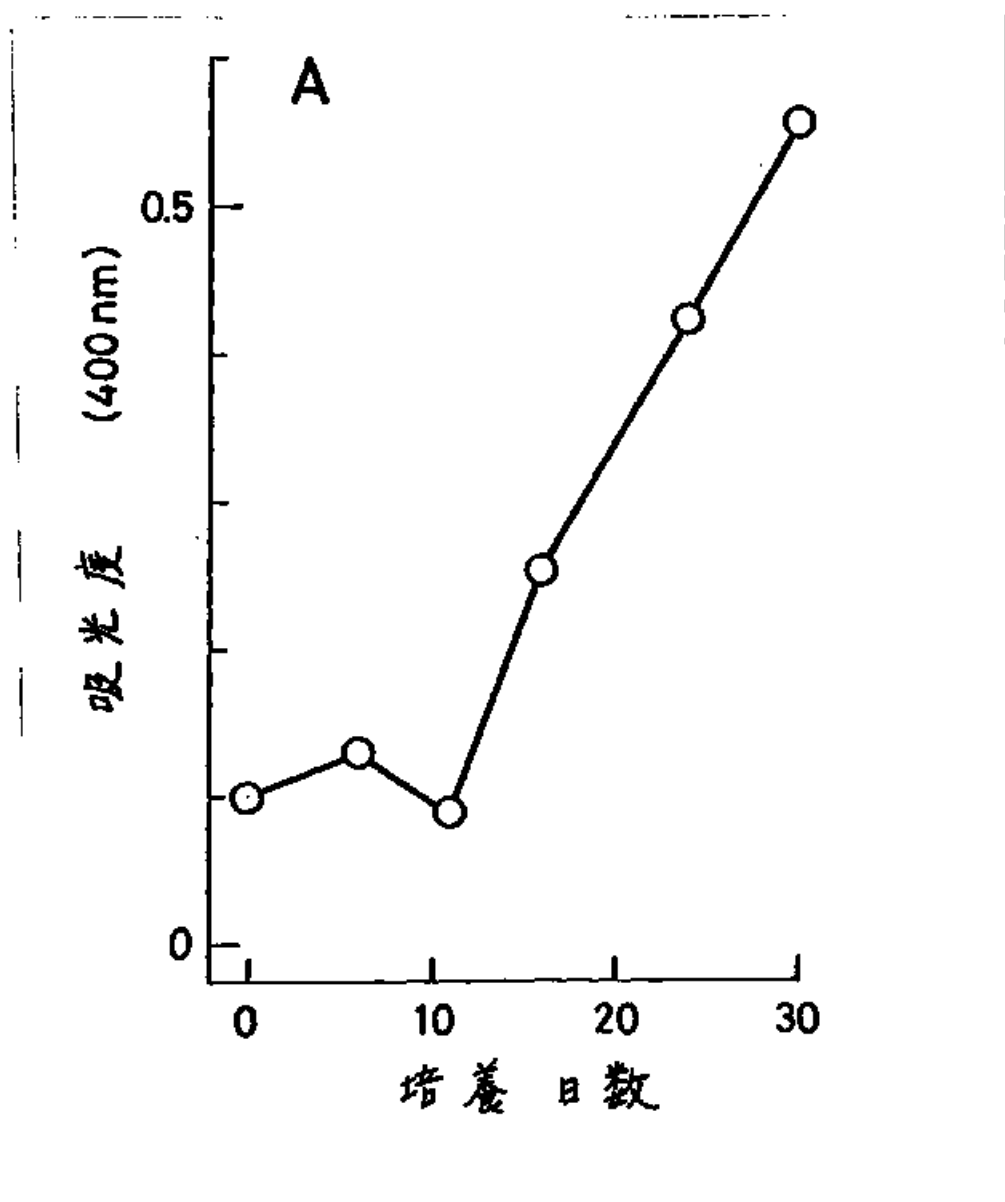


図 9

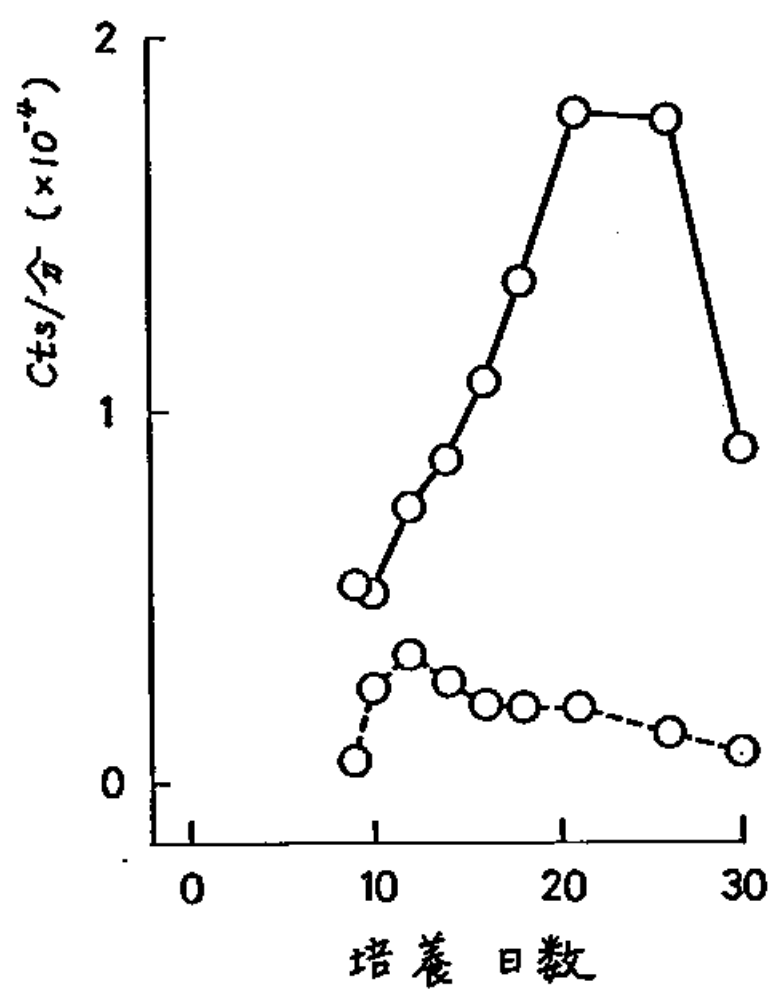
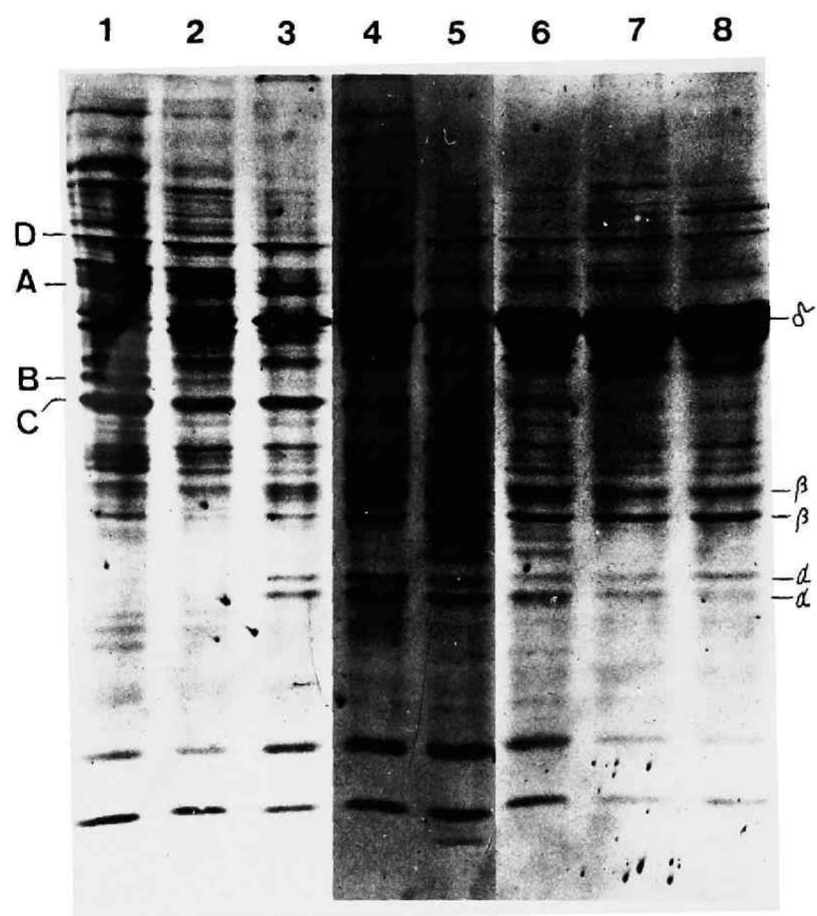
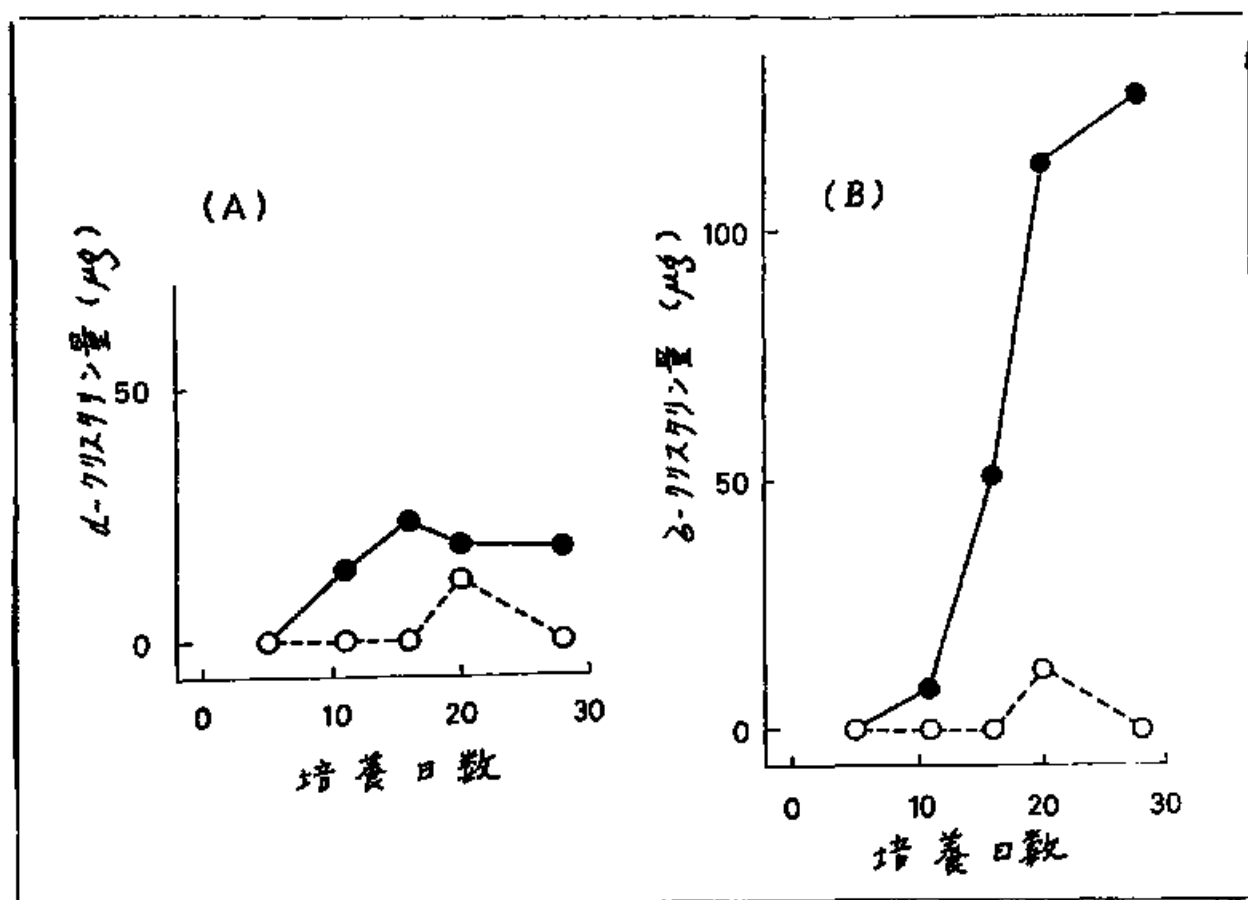


圖 10





2代目の培養におけるクリスタリン量 (μg)

初代培養の 培地	2代目の培養の 培地	クリスタリンの 種類	2代目での 培養日数	
			12日	18日
Eagle's MEM	MEM	α	56	61
		δ	18	107
	F-12	α	42	39
		δ	0	15
Ham's F-12	MEM	α	54	52
		δ	50	88
	F-12	α	23	27
		δ	0	4

表

1